

9. Hofer EL, Fernández Vallone VB, Labovsky V, Feldman L, Bordenave RH, LaRussa V, *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells from bone marrow of patients with lung and breast cancer. Libro del Congreso 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells 2009, abst 23, pg 30; Austin, TX, EE.UU.
10. Hofer EL, Labovsky V, LaRussa VJ, Vallone VF, Honegger AE, Belloc CG, *et al.* Mesenchymal stromal cells, colony-forming unit fibroblasts, from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients suppress fibroblast colony formation from healthy Marrow. Stem cells and development. 2010; 19: 359-70.
11. Fernández Vallone VB, Otaegui J, Dimase F, Batgelj E, Feldman L, Bordenave RH, Chasseing NA. Spontaneous osteoclastogenesis in bone marrow and peripheral blood of advanced breast cancer patients. Libro del Congreso 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells; 2009, abst 48, pg 57. Austin, TX, EE.UU.
12. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal Stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. Stem Cells 2010; 28: 788-98.

LABORATORIO DE INMUNOPATOLOGÍA

Glicómica de la respuesta inmune: el universo de glicanos y lectinas en microambientes inflamatorios y neoplásicos

Glycomics of the immune response: the universe of glycans and lectins in inflammatory and neoplastic microenvironments

Glicômica da resposta imune: o universo de glicanos e lectinas em microambientes inflamatórios e neoplásicos

Victoria Sundblad, Juan P. Cerliani, Daniel Compagno, Diego O Croci, Tomas Dalotto Moreno, L. Sebastián Dergan-Dylon, Santiago Di Lella, Claudia Gatto, Lucas Gentilini, Laura Giribaldi, Carlos M. Guardia, Juan M. Ilarregui, Diego J. Laderach, Verónica Martínez Alló, Iván D. Mascanfroni, Santiago Méndez Huergo, Mariana Salatino, Juan C. Stupirski, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich

Resumen

Las galectinas, una familia de lectinas que reconocen glicoconjugados específicos en la superficie celular y la matriz, participan en diversos procesos biológicos como reguladores de la homeostasis de la respuesta inmune y de la progresión tumoral. Considerando el papel inmunomodulador de Galectina-1 (Gal-1) en modelos de inflamación crónica y su contribución a la creación de microambientes tolerogénicos, durante los últimos años exploramos el impacto de esta proteína sobre el balance de células T y la funcionalidad de células dendríticas (CDs). Mientras las células Th1 y Th17 poseen el repertorio de glicanos necesarios para la unión de Gal-1, los linfocitos Th2 son resistentes a la unión de esta proteína, lo cual explicaría el incremento en la susceptibilidad de los linfocitos Th1 y Th17 a la apoptosis inducida por Gal-1 y la consecuente desviación en el balance de la respuesta inmune hacia un perfil Th2. Además, identificamos un circuito tolerogénico en el que Gal-1 induce la diferenciación de CDs tolerogénicas productoras de IL-27, la consecuente expansión de células T regulatorias productoras de IL-10 y la supresión de la inflamación mediada por células Th1 y Th17. Postulamos un nuevo mecanismo de regulación homeostática de la respuesta inmune basado en la interacción entre Gal-1 y sus glicanos específicos, el cual permite anticipar nuevos horizontes terapéuticos, en los que la modulación de la expresión de Gal-1 o sus glicanos nos permitiría regular la respuesta inmune.

Palabras clave: galectina-1 * células T * células dendríticas * tolerancia inmunológica

Summary

Galectins, a family of endogenous glycan-binding proteins able to recognize specific glycoconjugates on cell surface and extracellular matrix, control critical immunological processes involved in immune homeostasis and tumor progression. Given the immunosuppressive role of Galectin-1 (Gal-1) in different models of chronic inflammation and its contribution to the creation of tolerogenic microenvironments in cancer and pregnancy models, the impact of this protein on T helper cell balance and dendritic cells (DCs) functionality was explored. A novel mechanism, based on the differential glycosylation of T helper cell subsets, by which Gal-1 preferentially eliminates antigen-specific Th1 and Th17 cells, leading to a shift toward a Th2 profile was identified. While Th1- and Th17-differentiated cells expressed the repertoire of cell surface glycans that are critical for Gal-1-induced cell death, Th2 cells are protected from Gal-1 through differential sialylation of cell surface glycoproteins. More recently, the ability of Gal-1 to trigger the differentiation of tolerogenic dendritic cells (DCs), which promote resolution of autoimmune inflammation, was demonstrated. A tolerogenic circuit linking Gal-1 signaling, IL-27-producing DCs and IL-10-secreting T cells was identified. It can be postulated that molecular interactions between endogenous galectins and specific glycans constitute a novel mechanism of homeostatic regulation of immune responses. Understanding the role of protein-glycan interactions in the establishment of tolerogenic or inflammatory programs will enable the design of more rational immunotherapeutic strategies with broad biomedical implications.

Key words: galectin-1 * T cells * dendritic cells * immune tolerance

Resumo

As galectinas, uma família de lectinas que reconhecem glicoconjugados específicos na superfície celular e a matriz, participam em diversos processos biológicos como reguladores da homeostase da resposta imune e da progressão tumoral. Considerando o papel imunomodulador de Galectina-1 (Gal-1) em modelos de inflamação crônica e sua contribuição à criação de microambientes tolerogênicos, durante os últimos anos exploramos o impacto desta proteína sobre o balanço de células T e a funcionalidade de células dendríticas (CDs). Enquanto as células Th1 e Th17 possuem o repertório de glicanos necessários para a união de Gal-1, os linfócitos Th2 são resistentes à união desta proteína, o qual explicaria o incremento na suscetibilidade dos linfócitos Th1 e Th17 à apoptose induzida por Gal-1 e o consequente desvio no balanço da resposta imune para um perfil Th2. Além disso, identificamos um circuito tolerogênico no qual Gal-1 induz a diferenciação de CDs tolerogênicas produtoras de IL-27, a consequente expansão de células T regulatórias produtoras de IL-10 e a supressão da inflamação mediada por células Th1 e Th17. Postulamos um novo mecanismo de regulação homeostática da resposta imune baseado na interação entre Gal-1 e seus glicanos específicos, que permite antecipar novos horizontes terapêuticos, nos quais a modulação da expressão de Gal-1 ou seus glicanos nos permitiria regular a resposta imune.

Palavras chave: galectina-1 * células T * células dendríticas * tolerância imunológica

Introducción

En los últimos años, el estudio de la glicosilación diferencial de proteínas de superficie celular ha cobrado renovado interés, debido a la posibilidad de descifrar información biológica clave codificada en sacáridos específicos (1). Una gran variedad de glicanos, producto de la acción secuencial de un amplio repertorio de enzimas denominadas glicosiltransferasas y glicosidasas, decora la superficie de las células de nuestro organismo (2). La glicosilación de proteínas de superficie de células del sistema inmune puede modificarse drásticamente en condiciones fisiológicas y patológicas, regulando de esta forma procesos críticos de la respuesta inmune, tales como la activación de células T, la migración linfocitaria y la síntesis de citoquinas (1). Es así que el repertorio de glicanos en la superficie celular codifica información fisiológica clave que regula la homeostasis del sistema inmune. La tarea de decodificar dicha información recae sobre un número limitado de proteínas de unión a glicanos o lectinas endógenas (1)(3).

Las galectinas constituyen una familia de lectinas extremadamente conservadas a través de la evolución que reconocen y se unen a glicanos con configuración [Gal β 1-4NAcGlc] (4). Durante los últimos años se ha involucrado a esta familia en diversos procesos biológi-

cos como reguladores de la homeostasis de la respuesta inmune (3) y de la progresión tumoral (6). Hasta el momento se han descrito 15 miembros de esta familia en diversos tejidos de distintas especies (4). A pesar de la similitud de secuencia y especificidad de interacción con carbohidratos, algunos miembros de la familia de galectinas se comportan como amplificadores de la respuesta inmune, mientras que otros regulan negativamente el desarrollo de procesos inflamatorios (3).

Gal-1: una lectina endógena con propiedades anti-inflamatorias

Numerosas evidencias asignan a galectina-1 (Gal-1), un miembro 'proto-tipo' de la familia de galectinas, una función crítica en la homeostasis de la respuesta inmune e inflamatoria (3)(4) (Figura 1). Esta proteína es capaz de inhibir la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación, arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis (3)(4). Gal-1 se halla ausente en linfocitos T en reposo; sin embargo comienza a expresarse durante la activación de células T contribuyendo de este modo a la regulación negativa de la respuesta efectora. Más aún, se ha demostrado que Gal-1 se expresa en forma incrementada en células T regulatorias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ contribuyendo a su potencial inmunosupresor (3)(4).

En diferentes modelos experimentales de inflamación crónica y autoinmunidad (incluidos modelos de artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria intestinal, uveitis autoinmune y diabetes), la administración exógena de Gal-1 logró suprimir la inflamación dependiente de citoquinas Th1, promoviendo un incremento en la apoptosis de linfocitos T patogénicos y un desvío de la respuesta inflamatoria hacia un perfil Th2 (4). Por otro lado, en un modelo murino de abortos inducidos por stress, observamos que Gal-1 logró reestablecer la tolerancia inmunológica, disminuyendo las tasas de rechazo fetal al incrementar la frecuencia de células T regulatorias y células dendríticas (DCs) tolerogénicas en la interfase materno-fetal (5).

Se ha observado que Gal-1 se expresa en forma abundante en diversos tipos de tumores tales como próstata, melanoma, ovario, y mama, y su expresión correlaciona con la malignidad de dichos tumores y su potencial metastásico (6). En este contexto, en nuestro laboratorio demostramos que Gal-1 juega un papel crítico en fenómenos inmunosupresores en el microambiente tumoral. En el modelo experimental de melanoma B16 en ratones, demostramos previamente que Gal-1, sintetizada y secretada por células de melanoma, inhibe el desarrollo de una respuesta inmune Th1 antitumoral efectiva favoreciendo la progresión tumoral (7). El bloqueo de la actividad inmunosupresora de Gal-1 en el mi-

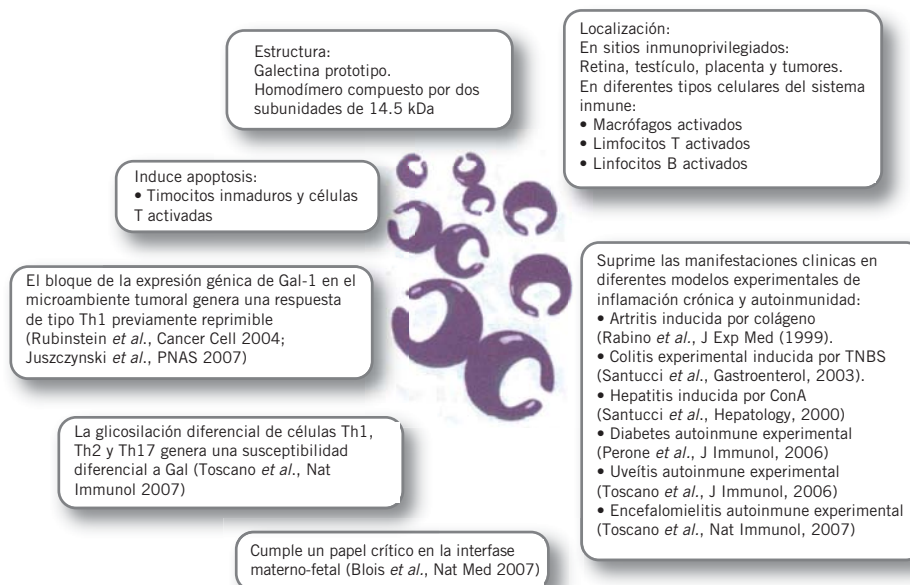


Figura 1. *Propiedades inmunomoduladoras de Galectina-1 (Gal-1)*

croambiente tumoral condujo a una respuesta mediada por células CD8 y Th1, lo cual resultó en un rechazo tumoral. Este efecto lo confirmamos en linfoma Hodgkin demostrando el papel de Gal-1 como factor promotor del escape tumoral a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción AP1 (8). En conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que la expresión de Gal-1 por células tumorales constituye un nuevo mecanismo de escape tumoral.

Teniendo en cuenta el papel de Gal-1 en diferentes modelos de inflamación crónica y su contribución a la creación de microambientes tolerógenicos, el estudio de los posibles mecanismos involucrados en estos efectos resulta de particular interés. Es así que en el laboratorio exploramos el impacto de Gal-1 sobre el balance de células T efectoras, y su efecto sobre la funcionalidad de DCs.

Impacto de la interacción entre Gal-1 y glicanos en la regulación de la fisiología de células T

Procesos como maduración tímica, activación, migración y apoptosis de linfocitos T constituyen algunos de los eventos de la fisiología linfocitaria que son regulados por interacciones entre proteínas y glicanos (9). Se ha demostrado que Gal-1 interacciona con alta avidéz con glicoconjugados que contienen residuos poli-LacNAc presentes en *N*-y *O*-glicanos (3) (4). La expresión y actividad de las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de secuencias de poli-LacNAc determinan la susceptibilidad a la apoptosis inducida por esta lectina *in vivo*. Además, la incorporación de ácido siálico en un enlace $\alpha(2\rightarrow6)$ a li-

gandos poli-LacNAc en *N*-glicanos, por la enzima ST6Gal I, inhibe la unión de Gal-1 y reduce la susceptibilidad de linfocitos T a la acción de esta proteína (3). De este modo, el enmascaramiento de ligandos específicos en la superficie celular podría controlar la unión de Gal-1 y evitar la inducción de apoptosis de linfocitos T.

En este sentido, en el laboratorio demostramos que la interacción entre Gal-1 y sus glicanos específicos constituye un paso clave en la regulación homeostática selectiva de las respuestas T. Notablemente, observamos que linfocitos Th1, Th2 y Th17 presentan una susceptibilidad diferencial a la apoptosis inducida por Gal-1. Al explorar los mecanismos involucrados, encontramos que, mientras las células Th1 y Th17 poseen el repertorio de glicanos necesarios para la unión de Gal-1, los linfocitos Th2 son resistentes a la unión de esta proteína ya que los residuos LacNAc se hallan decorados con ácido siálico en posición $\alpha2,6$ merced a la expresión de la sialiltransferasa ST6Gal I. *In vivo*, demostramos que la administración de Gal-1 inhibe la inflamación mediada por células Th1 y Th17 durante la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). En este contexto, ratones deficientes en el gen de Gal-1 (*Lgals1*^{-/-}) exhiben un incremento de la severidad de la respuesta inflamatoria frente al desafío con estímulos antigénicos en modelos experimentales de autoinmunidad (10).

Papel crítico de Gal-1 en la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas

Las DCs son células presentadoras de antígeno altamente especializadas en reconocer, procesar y presentar

antígenos a células T vírgenes. Tradicionalmente se ha identificado a las DCs como células capaces de promover la iniciación y amplificación de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, evidencias recientes indican que las DCs poseen a su vez la facultad de promover tolerancia y silenciar la respuesta inmune favoreciendo la expansión de células T regulatorias con fenotipo $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (T_{regs}) ó $FoxP3^+$ productoras de IL-10 ($Tr1$) (11). Se ha observado que citoquinas producidas por el estroma tumoral y mediadores anti-inflamatorios pueden favorecer la diferenciación de DCs capaces de silenciar la respuesta inmune (11). En búsqueda de posibles mecanismos responsables de la acción anti-inflamatoria de Gal-1 y considerando el papel crítico que cumplen las DCs en las decisiones entre tolerancia e inflamación, en nuestro laboratorio exploramos el impacto de Gal-1, tanto exógena como endógena, sobre la diferenciación, maduración, funcionalidad y capacidad regulatoria de DCs utilizando diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

DCs derivadas de médula ósea diferenciadas en presencia de Gal-1 (DC_{Gal-1}) exhibieron un perfil regulatorio dependiente de la producción de IL-27 y de la activación del factor de transcripción STAT3, en comparación con DCs controles (12). La función tolerogénica de DC_{Gal-1} fue confirmada en cultivos alogénicos *in vitro* y desafíos antígeno-específicos *in vivo*. La relevancia fisiopatológica de DCs diferenciadas en presencia de Gal-1 fue demostrada en modelos experimentales de cáncer e inflamación crónica. DC_{Gal-1} demostraron menor capacidad de proteger ratones

singénicos frente al desafío con melanoma B16, favoreciendo la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral. En un abordaje terapéutico, observamos que la administración de DC_{Gal-1} suprimió las manifestaciones clínicas de autoinmunidad e inhibió las respuestas patogénicas Th1 y Th17. Nuestros resultados revelaron la capacidad de Gal-1 de iniciar un circuito tolerogénico al interactuar con glicanos presentes en DCs inmaduras, y de esta forma generar DCs tolerogénicas productoras de IL-27 que inducen la diferenciación de células $Tr1$ productoras de IL-10 (12). Estos hallazgos sugieren un papel jerárquico clave para Gal-1 en la iniciación de circuitos inmunosupresores *in vivo* y en la generación de DCs regulatorias con potencial tolerogénico en enfermedades inflamatorias y cáncer.

Conclusiones y Perspectivas Futuras

En conjunto estos resultados permiten postular un nuevo mecanismo de regulación homeostática de la respuesta inmune basado en la interacción entre Gal-1 y sus glicanos específicos. La glicosilación diferencial de los linfocitos Th1, Th2 y Th17 explicaría el incremento en la susceptibilidad de los linfocitos Th1 y Th17 a la muerte celular inducida por activación y la consecuente desviación en el balance de la respuesta inmune hacia un perfil Th2, observados en modelos de inflamación crónica luego del tratamiento con esta lectina (Figura 2). Además, identificamos un circuito tolerogénico en el que la señalización vía Gal-1 conduce a la diferenciación

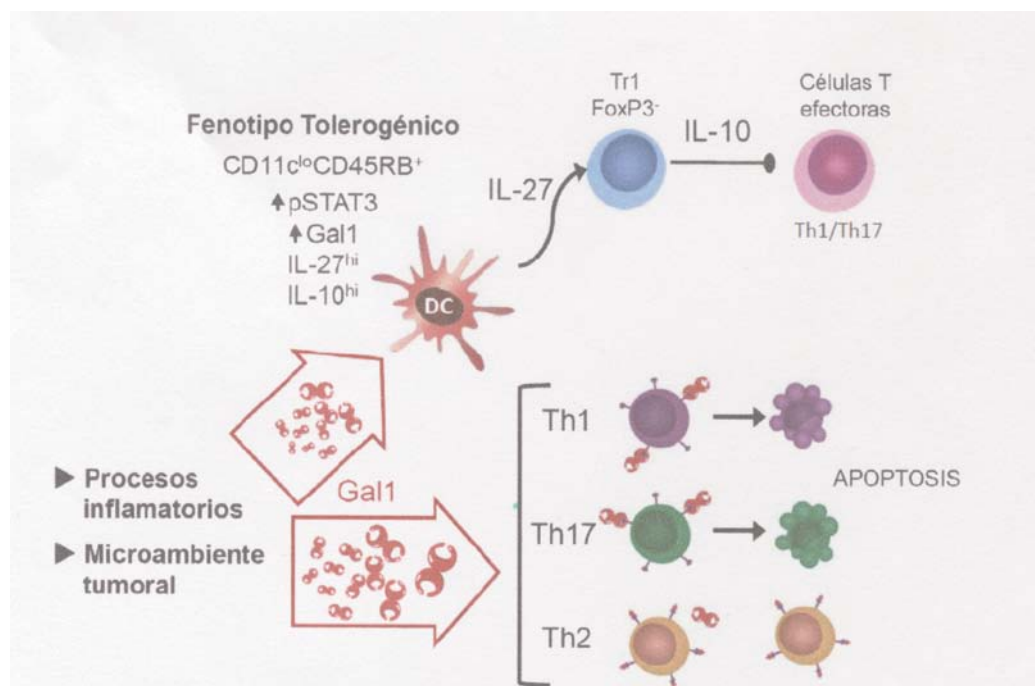


Figura 2. Galectinas: Un nuevo paradigma en la respuesta inmune. Acción selectiva de Gal-1 sobre células dendríticas (DC) y diferentes poblaciones de células T (Th1, Th17 y Th2).

de DCs tolerogénicas productoras de IL-27, con la consecuente expansión de células T regulatorias productoras de IL-10 y la supresión de la inflamación mediada por células Th1 y Th17 (Figura 2). A la luz de estos resultados es posible anticipar nuevos horizontes terapéuticos en diferentes patologías, tales como procesos neoplásicos o infecciosos, en los que la inhibición de la expresión de Gal-1 o sus glicanos nos permitiría potenciar la respuesta inmune. Por otro lado en procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes y en episodios de rechazo de trasplantes, la inducción de DCs con capacidad tolerogénica por estimulación con Gal-1 brindaría importantes beneficios terapéuticos generando efectos inmunomoduladores selectivos lo cual constituye EL MAYOR DESAFÍO DE LA INMUNOLOGÍA DE ESTE NUEVO MILENIO.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de nuestro equipo fueron financiados en los últimos 5 años por el CONICET (PIP 2008), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT; PICT 2006; PICT Bicentenario 2010), la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 2010-2012), la Fundación Florencio Fiorini (2007), la Fundación Sales (Programa Sales/CONICET 2000-presente), el Cancer Research Institute (New York 2006-2011), la Mizutani Foundation for Glycoscience (Tokio, Programa 2005 y Programa 2011), la Prostate Cancer Research Foundation (London; 2009-2012). Agradecemos a todos los miembros y colaboradores administrativos y técnicos del IBYME por su apoyo y colaboración desinteresada

Referencias bibliográficas

1. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunol* 2008; 9: 593-601.
2. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006; 126: 855-67.
3. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Rev. Immunol* 2009; 9: 338-52.
4. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1183: 158-82.
5. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, *et al.* A pivotal role for galectin-1 in foetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007; 13: 1450-7.
6. Liu F, Rabinovich G. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 29-41.
7. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5: 241-51.
8. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, *et al.* The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13134-9.
9. Lowe JB. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell* 2001; 104: 809-12.
10. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunol* 2007; 8: 825-34.
11. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev Immunol* 2007; 25: 267-96.
12. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature Immunol* 2009; 10: 981-91.

LABORATORIO DE INMUNOPATOLOGÍA

Células NK: una interfase entre la inmunidad innata y adaptativa con potencial inmunoterapéutico.

NK cells: an interphase between innate and adaptive immunity with immunotherapeutic potential

Células NK: uma interfase entre a imunidade inata e adaptativa com potencial imunoterapêutico

Norberto W. Zwirner, Mercedes B. Fuertes, Carolina I. Domaica, Lucas E. Rossi, Damián E. Ávila, Raúl G. Spallanzani, Andrea Ziblat, Ximena Raffo Iraolagoitia

Resumen

Las células citotóxicas naturales o NK juegan un rol crítico en la inmunovigilancia contra tumores y regulan la respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas y la citotoxicidad. Los receptores NKG2D y NKp46 juegan un rol central en dichos procesos. No obstante, las células NK son blanco de mecanismos de escape tumoral tal como la